



# PRODUCTION OF ERYTHROPOIETIN

<b>Publication number:</b>	JP62269697 (A)	<b>Also published as:</b>	
<b>Publication date:</b>	1987-11-24		JP3079000 (B)
<b>Inventor(s):</b>	UEDA MASAJI; AKAI KUNIHISA; MURAKAMI MASAHIKO; CHIBA HIDEO; SASAKI RYUZO +		JP1999303 (C)
<b>Applicant(s):</b>	SNOW BRAND MILK PROD CO LTD +		
<b>Classification:</b>			
- international:	<b>A61K35/12; A61K38/22; C07K1/22; C07K14/00; C07K14/505; C07K14/52; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/85; C12P21/00; C12R1/91; A61K35/12; A61K38/22; C07K1/00; C07K14/00; C07K14/435; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/85; C12P21/00; (IPC1-7): A61K35/12; A61K37/24; C12N15/00; C12P21/00; C12R1/91</b>		
- European:	C07K14/505; C12N15/85		
<b>Application number:</b>	JP19860112537 19860519		
<b>Priority number(s):</b>	JP19860112537 19860519		

## Abstract of JP 62269697 (A)

PURPOSE:To obtains erythropoietin, an erythrogenic promotion factor, in high purity and in high efficiency, by producing by the use of recombinant DNA technique and by using a monoclonal antibody adsorption column. CONSTITUTION:An erythropoietin gene is inserted into a vector containing promotor for retrovirus LTR (long terminal repeat). A transduced vector thus obtained is transduced to psi 2 cell or BHK21 cell by DNA transfection method to give an erythropoietin-forming cell. Erythropoietin is isolated from the culture solution of the cell by using a monoclonal anti-human erythropoietin antibody adsorption column.

.....  
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-269697

⑤Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬公開 昭和62年(1987)11月24日
C 12 P 21/00		6712-4B	
A 61 K 35/12		8615-4C	
		8615-4C	
C 12 N 37/24		7115-4B	
//(C 12 P 21/00			
C 12 R 1:91)			
審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)			

⑭発明の名称 エリスロポエチンの製造方法

⑰特 願 昭61-112537

⑱出 願 昭61(1986)5月19日

⑲発 明 者	上 田 正 次	川越市今福1672の1の719
⑲発 明 者	赤 井 邦 久	宇都宮市東宿郷3-4-7 政邦コーポ304
⑲発 明 者	村 上 晶 彦	宇都宮市東宿郷3-4-7 政邦コーポ305
⑲発 明 者	千 葉 英 雄	宇治市広野町新成田100-131
⑲発 明 者	佐 々 木 隆 造	京都市左京区田中高原町14
⑲出 願 人	雪印乳業株式会社	札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
⑲代 理 人	弁理士 宮田 広豊	

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

エリスロポエチンの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

- (1) エリスロポエチン遺伝子を、レトロウイルスLTR(long terminal repeat)のプロモーターを有するベクターに挿入することによりエリスロポエチン形質導入ベクターを作成し、該エリスロポエチン形質導入ベクターをDNAトランスフェクション法によりプサイ(Ψ)2細胞或はBHK21細胞へ導入してエリスロポエチン産生細胞を作成するとともにエリスロポエチンを恒常的に産生する細胞を樹立し、次いで該細胞を培養してエリスロポエチンを生産し、得られたエリスロポエチンをモノクローナル抗ヒト・エリスロポエチン抗体吸着カラムにより単離することを特徴とするエリスロポエチンの製造方法。

- (2) エリスロポエチン形質導入ベクターは、全エ

リスロポエチンゲノム遺伝子を、プラスミドpUC8の制限酵素EcoRIとSmaIによる切断部位に挿入したプラスミドpHPI404を制限酵素BglII及びBamHIで切断してエリスロポエチン遺伝子を分離し、該エリスロポエチン遺伝子を哺乳動物細胞用シャトルベクター-pZIP-NeoSV(X)1のLTRの下流でNeo<sup>r</sup>遺伝子の下流の制限酵素BamHI切断部位に挿入し、エリスロポエチン遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得られる、選択マーカー-neo<sup>r</sup>遺伝子を含有するエリスロポエチン形質導入ベクターである特許請求の範囲第(1)項記載のエリスロポエチンの製造方法。

- (3) エリスロポエチン形質導入ベクターは、ヒトゲノムエリスロポエチン遺伝子を哺乳動物細胞用シャトルベクター-pKSV-10のSV-40初期遺伝子プロモーターの下流に挿入したエリスロポエチン遺伝子発現ベクター-pSVhEPXを制限酵素ApaIで切断した後、T4ポリメラーゼで3'突起

部位を除去し、次いで制限酵素 BamHI で切断してエリスロポエチン遺伝子を含む切断片を得、一方 CAT 遺伝子発現ベクター-pMLVCAT 制限酵素 BamHI と SmaI で切断して LTR を含む切断片を得、このようにして得た両断片を T4 リガーゼにより接続してエリスロポエチン遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得られるエリスロポエチン形質導入ベクター(neo<sup>r</sup> 遺伝子を含まない)である特許請求の範囲第(1)項記載のエリスロポエチンの製造方法。

(4) 上記選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子を含むエリスロポエチン形質導入ベクターを DNA トランスフェクション法によりブサイ(Ψ)2 細胞或は BHK21 細胞へ導入してエリスロポエチン産生細胞を作成する特許請求の範囲第(1)項記載のエリスロポエチンの製造方法。

(5) 上記エリスロポエチン形質導入ベクター(neo<sup>r</sup> 遺伝子を含まない)を選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝

子導入ベクター-pKSVNeo と混合して DNA トランスフェクション法により BHK21 細胞へ導入してエリスロポエチン産生細胞を作成する特許請求の範囲第(1)項記載のエリスロポエチンの製造方法。

(6) 選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクター-pKSVNeo は、選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子を含むプラスミド pNEO を制限酵素 Hind III で切断した後、Klenow 酵素 (DNA ポリメラーゼ I) で 5' 突起を修復し、次いで BamHI リンカーを接続した後、BamHI で切断した neo 遺伝子(1946 bp)断片をシャトルベクター-pKSV-10 の Bgl II による切断部位に挿入して該シャトルベクター-pKSV-10 の SV40 の初期遺伝子プロモーターの下流に neo 遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得られたものである特許請求の範囲第(5)項記載のエリスロポエチンの製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、造血因子、すなわち、赤血球生成促進因子であるエリスロポエチン(ヒト・エリスロポエチン)の製造方法、さらに詳しくは、組換え DNA 技術によりエリスロポエチンの高い産生能を有する細胞を作成し、該エリスロポエチン産生細胞を用いてヒト・エリスロポエチンを効率的に製造する方法に関する。

#### 従来の技術とその問題点

エリスロポエチンは、骨髓に存在する赤血球系前駆細胞(CFU-E)に作用して、赤血球細胞への分化を促進する赤血球生成促進因子であつて、ヒト・エリスロポエチンの物性は下記のとおり報告されている。

ヒト・エリスロポエチンは、分子量35,000を有する糖タンパク質であつて、(Yanagawa S. et al. 「J. Biol. Chem.」(ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリイ)、259, 2707-2710 (1984))、そのペプチド部分は 166個のアミノ酸より成る 1

本鎖ポリペプチドである(Jacob K. et al. 「Nature」(ネーチャ)、313, 806-810 (1985))とそれぞれ報告されている。

また、ヒト・エリスロポエチンの cDNA 及びゲノム DNA の構造も上記 Jacob K. 等の報告にみられるとおり明らかにされている。

また、エリスロポエチンの臨床的効用については、貧血患者の尿より採取して純化した標品を用いての動物実験に基づいて、エリスロポエチンの赤血球産生の亢進効果が確認されている(Masunaga H. et al. 「Acta Hematol Jpn.」in press (アクト ヒマトロジイ ジャパン) インプレス)。

したがつて、エリスロポエチンは、臨床上の応用として腎疾患患者の貧血治療、腎不全或は腎摘出後の血液透析患者の貧血防止、手術後患者の赤血球産生増進による回復促進等への適応が可能な医薬に用いられる。

而して、エリスロポエチンは、上述のように臨床貧血治療への応用が期待されるものの、医薬

としての高純物のものを大量に供給することが困難であるため、医薬品として開発は遅れているのが現状である。すなわち、エリスロポエチンは再生不良性貧血患者の尿中に含まれていることから、従来は、該尿から分離、採取して精製したものを試験研究に用いられるにすぎなかつた。

このような状況に鑑み、本発明者等は、最近エリスロポエチンで免疫した実験動物の脾臓細胞とミエローマ細胞とを細胞融合させたハイブリドーマより得られるモノクローナル抗エリスロポエチン抗体を結合した吸着剤を用いることにより、貧血患者尿から純粋なエリスロポエチンを高収率で製造する方法を開発した(特開昭60-41614号)。

しかし、上記方法によるも原料としての上記尿の供給が制限されるため、エリスロポエチンを大量に生産して医薬として定常的に供給することは困難とされる。

したがって、エリスロポエチンを貧血治療用医薬として提供するには、高い生産量を示すエリス

本発明者は、エリスロポエチン遺伝子を、特別に作成したベクターを介してマウス由来のブサイ(Ψ)2細胞或はシリアンハムスター子腎由来のBHK21細胞へ導入することによりエリスロポエチンを恒常的に効率よく産生する細胞を作成し、得られたエリスロポエチン産生細胞を培養してエリスロポエチンを生産し、次いでエリスロポエチンを単離、精製することにより、上記課題の解決に成功した。

以下本発明を詳しく説明する。

#### 発明の構成

本発明の特徴は、エリスロポエチン遺伝子を、レトロウイルスLTR(long terminal repeat)のプロモーターを有するベクターに挿入することによりエリスロポエチン形質導入ベクターを作成し、該エリスロポエチン形質導入ベクターをDNAトランスフェクション法によりブサイ(Ψ)2細胞或はBHK21細胞へ導入してエリスロポエチン産生細胞を作成するとともにエリスロポエチンを恒常

にエリスロポエチン産生細胞の作成を確立することにより、高純度のエリスロポエチンを高収率で製造するための技術を確立する必要があると考えられている。

#### 発明が解決しようとする課題

本発明は、エリスロポエチン生産上の上述した状況に鑑みなされたものであつて、組換えDNA技術を利用することにより、エリスロポエチンの高い生産能を有するエリスロポエチン産生細胞を作成し、該細胞を培養して得られたエリスロポエチンをモノクローナル抗ヒト・エリスロポエチン抗体吸着カラムを用いて精製することにより、高純度のエリスロポエチンを高収率で製造し得る方法を提供することを課題とする。すなわち、本発明は、貧血患者尿或は低い生産性のエリスロポエチン産生細胞の培養上清液を原料として用いてエリスロポエチンを製造することから成る従来方法の問題点であつた原料上の制約を解消して、エリスロポエチンを大量生産方式で製造することを可能とするものである。

的に産生する細胞を樹立し、次いで該細胞を培養してエリスロポエチンを生産し、得られたエリスロポエチンをモノクローナル抗ヒト・エリスロポエチン抗体吸着カラムにより単離することにある。

#### 課題を解決するための手段

本発明では、まず下記手段に従つてエリスロポエチン形質導入ベクターを作成する。

①選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子を含有するエリスロポエチン形質導入ベクターの作成：

ヒト・ゲノムDNAライブラリーから入手した全エリスロポエチンゲノム遺伝子を、プラスミドpUC8の制限酵素EcoRIとSmaIによる切断部位に挿入したプラスミドpPhEP1404を制限酵素BglII及びBamHIで切断してエリスロポエチン遺伝子を分離し、該エリスロポエチン遺伝子を哺乳動物細胞用シヤトルベクター-pZIP-NeoSV(X)1のLTRの下流でNeo<sup>r</sup> 遺伝子上流の制限酵素BamHI切断部位に挿入し、エリスロポエチン遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得

られる。

②エリスロポエチン形質導入ベクター（選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子を含まない）の作成：

ヒトゲノムエリスロポエチン遺伝子を哺乳動物細胞用シヤトルベクター-pKSV-10 の SV-40初期遺伝子プロモーターの下流に挿入したエリスロポエチン遺伝子発現ベクター pSVhEPX を制限酵素ApaIで切断した後、T4ポリメラーゼで 3' 突起部位を除去し、次いで制限酵素 BamHIで切断してエリスロポエチン遺伝子を含む切断片を得、一方 CAT遺伝子発現ベクター-pMLVCAT を制限酵素 BamHIと SamIで切断してLTRを含む切断片を得、このようにして得た両断片をT4リガーゼにより接続してエリスロポエチン遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得られる。

また、上記②により作成されるエリスロポエチン形質導入ベクターを用いて動物細胞でエリスロポエチンの形質導入を行うに際して、エリスロポエチン遺伝子を動物細胞において高く発現させる

するものであつて、下記手順によりエリスロポエチン遺伝子を動物細胞へ導入する。

上記①により作成した選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子を含むエリスロポエチン形質導入ベクターを用いる場合は、該ベクター単独を、リン酸カルシウムを用いるDNAトランスフェクション法によりプサイ(Ψ)2細胞（マウス由来）或はBHK 21細胞（シリアンハムスター子腎由来）へ導入し、上記②により作成した neo<sup>r</sup> 遺伝子を含まないエリスロポエチン形質導入ベクターを用いる場合は、上記③により作成した選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクターを好ましくは10:1の割合で混入して、リン酸カルシウムを用いるDNAトランスフェクション法によりBHK21細胞（シリアンハムスター子腎由来）に導入する。

次に、上述のごとくしてエリスロポエチン遺伝子を導入することによる、上記動物細胞におけるエリスロポエチン遺伝子の発現は、G418耐性細胞の生成により確認し得る。すなわち、エリスロポ

ために上記形質導入ベクターと混合して用いる選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクターは下記手順に従つて作成し得る。

③選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクター(pKSVNeo)の作成：

選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子を含むプラスミドpNEOを制限酵素HindIIIで切断した後、Klenow酵素DNAポリメラーゼで 5' 突起を修復し、次いで BamHIリンカーを接続した後、BamHIで切断した neo遺伝子(1946 bp)断片をシヤトルベクター-pKSV-10 の BglIIによる切断部位に挿入して該シヤトルベクター-pKSV-10 の SV40 の初期遺伝子プロモーターの下流に neo遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得られる。

本発明は、上述のようにして作成されたエリスロポエチン形質導入ベクターを用いてエリスロポエチン遺伝子を動物細胞に導入することによりエリスロポエチン遺伝子を高く発現した細胞を作成

エチン遺伝子を導入した細胞を希釈して培地に接種して培養し、この培養液にG418を添加して培養を行い生成するG418耐性細胞を選択し、さらに、培養液中にエリスロポエチンを放出している細胞を選択する。

次いで、このようにして選択した細胞を限界希釈法によりエリスロポエチン遺伝子を発現している細胞をクローニングすることによる発現の高いものを選択し、エリスロポエチン遺伝子を恒常的に産生する細胞株を樹立する。

なお、上記樹立された細胞株により産生されるエリスロポエチンの確認はラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用いた in vitro パイオアッセイ法により行つた。

次に、上述のようにして作成したエリスロポエチン産生細胞を血清を含む合成培地中で培養し、得られた培養上清を限外濾過膜（分画分子量13000）を用いて高分子成分を濃縮して分離した後、上清液をモノクローナル抗ヒト・エリスロポエチン抗

体吸着カラムに通し、次いで溶出して得られる溶出液をゲル濾過することによりエリスロポエチンを単離して精製組換えエリスロポエチンを得る。

以下に実施例を示して本発明及びその効果を具体的に説明する。

#### 実施例 1

本例は、選択マーカー遺伝子とエリスロポエチン遺伝子を同一ベクター上に含有するベクターを用いて作成したエリスロポエチン産生細胞によるエリスロポエチンの製造を示したものである。

#### 選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子を含有するエリスロポエチン形質導入ベクター (pZIPNeoSV(X)EP0) の作成

116  $\mu$ l の TE-緩衝液 (10mM Tris-HCl、1mM EDTA pH 7.4) に溶解したプラスミド pBEP1404 (プラスミド pUC8 の制限酵素 EcoRI、SmaI 切断部位にエリスロポエチンゲノム遺伝子の 5' 末端 ApaI 切断部位より下流部位 2.4kb の断片を挿入したもの；大きさ 5.1kb) 10  $\mu$ g に対し、5 倍濃度の Bgl II 反

応緩衝液 (Bgl II 反応緩衝液に同じ) 20  $\mu$ l を加えた後、制限酵素 BamHI を加え、37℃ で 1 時間反応させ、開環させた。

この反応液をフェノール抽出 1 回、エーテル抽出 3 回、エタノール沈殿 1 回の処理を行い、DNA を乾燥させた。350ng (ナノグラム  $10^{-9}$ g) の BamHI 開環 pZIP-NeoSV(X)1 (4  $\mu$ l の水に溶解) に 200ng のエリスロポエチン遺伝子 (16  $\mu$ l)、2  $\mu$ l の 10 倍濃度 ligation 反応緩衝液 (660mM Tris-HCl、66mM MgCl<sub>2</sub>、100mM DTT、pH 7.6) 2  $\mu$ l の 9mM ATP 及び 3  $\mu$ l の T4 DNA ligase (8.4 単位) を加え、4℃ で 1 晩反応を行った。反応液を 2 回フェノール抽出、3 回エーテル抽出、1 回エタノール沈殿の処理を行った後、DNA を乾燥させ 20  $\mu$ l の TE-緩衝液に溶解して、形質転換用 DNA 溶液とした。その DNA 溶液 10  $\mu$ l を用いて、200  $\mu$ l の大腸菌 DH-1 コンピテント (Competent) 細胞を形質転換した (形質転換頻度  $3 \times 10^6$  個/ $\mu$ g pBR322)。

以上の操作により、35 株のアンピシリンーカナ

マイシン耐性形質転換株を得た。うち 11 株について、プラスミドの制限酵素切断地図解析を行い、目的とするエリスロポエチン形質導入ベクターを有する 4 株を選択した。さらにうち 1 株を用い、常法に従い、プラスミド調製を行い、エリスロポエチン形質導入ベクター (pZIPNeoSV(X)EP0) を作成した。次いで、このようにして作成したエリスロポエチン形質導入ベクターを用い、DNA トランスフェクション法により下記手順でエリスロポエチン遺伝子を動物細胞へ導入した。

一方、シャトルベクター pZIP-NeoSV(X)1 5  $\mu$ g (5  $\mu$ l の TE-緩衝液に溶解) に 5 倍濃度の BamHI

反応緩衝液 (50mM Tris-HCl、35mM MgCl<sub>2</sub>、500mM NaCl、35mMメルカプトエタノール) 40  $\mu$ l を加えた後に、各 20 単位の制限酵素 Bgl II 及び BamHI を加え、37℃、2 時間反応した後、3.5% アクリルアミドゲル電気泳動を行い、2.4kb の Bgl II-BamHI 断片 (エリスロポエチン遺伝子) に相当するゲルの部位を切り出し、ゲルを微細に破砕した後、溶出用緩衝液 (0.5M 酢酸アンモニウム、1mM EDTA、0.1% SDS pH 8.0) を 1.0ml 加え、37℃ で 1 晩インキュベートし、DNA の抽出を行った。DNA は遠心によりアクリルアミドゲルを沈降させ、上層の水層を集め、1 回のフェノール抽出、3 回のエーテル抽出により、水層に含まれるフェノールを除去した後、2 倍量のエタノールを加え DNA 断片を沈降させた。DNA 断片 (沈降) を遠心により回収し、DNA を乾燥させた後 20  $\mu$ l の滅菌水に溶解し、エリスロポエチン遺伝子溶液とした。

#### (イ) プサイ (Ψ) 2 細胞へのエリスロポエチン遺伝子の導入

$4 \times 10^5$  個のマウス由来の Ψ2 細胞を 6cm 径シャーレに播種し、翌日、リン酸カルシウム法による DNA トランスフェクションを行った。すなわち、50  $\mu$ l の水に溶解した 50  $\mu$ g の pZIP-NeoSV(X)EP0、300  $\mu$ l の 2M 塩化カルシウム液及び水 2.1ml を混合し A 溶液とした。次に、B 溶液として、0.28M NaCl を含む 50mM HEPES (pH 7.1) 2.5ml と 35mM

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -35mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100  $\mu\text{l}$  を混合した。B 溶液をはげしく攪拌しながら、これにA溶液を徐々に滴下し、DNAをリン酸カルシウムと共沈し、室温で30分間放置することにより沈澱を成長させた。

上記のようにして調製したDNA-リン酸カルシウム液0.4mlを先に調製した $\Psi$ 2細胞の培養液 (Dulbecco's Modified Eagle MEM(DME)+10%子牛血清(CS)) 4ml中に添加し、18時間  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で培養した。

得られた培養液に25%グリセロールを含むPBS溶液0.4mlを加え、1分間放置した後、DME溶液で3回洗浄後、4mlの上記培養液を加え、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内で更に培養を行つた。1日後、培養液を交換し、翌日シャーレ5枚に播種し直した(1/5 Split)。さらに、翌日から400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のG418を含む培養液に取り換え、その後適時、培養液を交換し、2週間培養を行い、G418耐性細胞を選択し、限界希釈法によりクローニングを行つた。

#### の導入

上記 $\Psi$ 2細胞へのエリスロポエチン遺伝子の導入方法と同様な手順で行つた。すなわち、 $2 \times 10^6$ 個のBHK21細胞をDNAトランスフェクションの前日に25 $\text{cm}^2$ -フラスコに播種し(培養液: Basal Medium Eagle (BME)+10%CS+10% Tryptose Phosphate Broth)、前記と同様なDNA-リン酸カルシウム溶液を用い、BHK21細胞へのDNAトランスフェクションを行つた。次いでG418耐性細胞を選択後、2回の限界希釈法を用いた細胞のクローン化を行い、エリスロポエチンを恒常的に生産する細胞株を樹立し、EPOBX7Aと命名した。本細胞株のエリスロポエチンとその生産量をラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用いた *in vitro* バイオアッセイ法で調べた結果、両者は同一の活性を示し、1000単位/ $10^6$ cell/dayであつた。

次に、上述のようにして組換えを行つて作成したエリスロポエチン産生細胞、EPO $\Psi$ ×9Eを

クローニング時に適時G418 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む培養液を取り換え、2週間後、96穴マイクロプレート1枚当り19ウェル(プレート1枚当り50細胞を播種)にコロニーを見出した。

上記により見出されたコロニーの培養上清中のエリスロポエチン活性をラジオイムノアッセイ法(RIA)により測定した結果、全ての培養上清についてエリスロポエチン活性(0.02~2単位/ $\text{ml}$ )が認められ、エリスロポエチン遺伝子発現量の高いコロニーを選出し、G418含有培養液で増殖後、再び同様にして限界希釈法を行つてエリスロポエチンを恒常的に生産する細胞株を樹立し、EPO $\Psi$ ×9Eと命名した。なお、EPO $\Psi$ ×9Eの培養上清中に見出されるエリスロポエチンとその生産量をラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用いた *in vitro* バイオアッセイ法で調べた結果、両者は同一の活性を示し、1500単位/ $10^6$ cell/dayであつた。

#### (ロ) BHK21細胞へのエリスロポエチン遺伝子

下記手順により培養してエリスロポエチンを生産し、次いで単離を行つた。なお、EPOBX7A細胞を用いて同様にしてエリスロポエチンを生産し得た。

#### 組換え(Recombinant) エリスロポエチンの生産と単離

EPO $\Psi$ ×9E  $1.5 \times 10^6$  細胞をセルフアクトリ-10チャンバー(6000 $\text{cm}^2$ )(ヌンク社製)に播種し、培養液(Dulbecco's Modified Eagle MEM(DME)+10%子牛血清(CS)) 1 $\text{l}$ 存在下で3日間培養した後、3日毎に2 $\text{l}$ の培養液と交換した。本培養液中に含まれるエリスロポエチン活性をラジオイムノアッセイ法で定量した結果、100~300単位/ $\text{ml}$ であつた。エリスロポエチンの単離は特開昭60-41614号の方法に準じて行つた。

上記の方法で培養して得られた培養液1 $\text{l}$ (EPO活性  $2.0 \times 10^6$  単位含有)を温度管理(5~10 $^{\circ}\text{C}$ )下において、限外濾過装置を用いて分子量1万以上の画分の濃縮し、さらに、PBS(リン酸塩緩衝食

塩水)を加え、同様に濃縮することにより、エリスロポエチン濃縮液 1.5ℓを得た。

本濃縮液に 2% SDS とする様に SDS粉末を加え、100℃ 3分間加熱後、4℃に冷却し、さらに 0℃で 1晩放置した後、遠心により SDSを除去し、上清液 1.2ℓを得た。本上清液をモノクローナル抗ヒト・エリスロポエチン抗体を Affi-Gel 10 に吸着させて作成した抗体吸着カラム (抗体吸着量: 0.5g/10mℓ Affi-Gel 10; 3.6cm×3cm 床容量 30mℓ) に 60mℓ/hrの流速で通した。次に PBS 2000mℓ、0.5M NaCl を含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7.4)、400mℓ、0.15M NaCl 400mℓの順に 100mℓ/hrでカラムを洗浄後、0.2M酢酸と0.15M NaClとの混合液を 30mℓ/hrの流速で流し、溶出液として100mℓを得た。尚、本溶出液中には、エリスロポエチン活性が  $1.2 \times 10^4$  単位含まれていた。さらに次のようにしてゲル濾過を行った。

上記溶出液に対し、3.4Mトリス溶液を適量加え、中和後水に対して透析した後、凍結乾燥を行うこ

とにより濃縮を行った。次に本凍結乾燥粉末に 0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 6mℓに溶解し、そのうちの3mℓを予め、前記と同じ緩衝液で平衡化したセファデックスG100 充填カラム (1.2cm×150cm、床容量170mℓ) に 6mℓ/hrで通し、分子量による分画を行い、高分子不純物を除去し、エリスロポエチン活性画分を得た。残り3mℓのエリスロポエチン濃縮液も同様の操作を行うことにより分子量分画を行い、エリスロポエチン活性画分を得た。両操作によつて得られたエリスロポエチンは  $1.08 \times 10^4$  単位であった。本標品の純度検定を SDSポリアクリルアミド電気泳動法により行つたが、不純なタンパク質は認められなかつた (分子量約 35000の部位に単一なバンドとして認められた)。

以上の様にして高純度の  $\gamma$ -エリスロポエチンを取得することができた。

#### 実施例 2

本例は、エリスロポエチン形質導入ベクターと

選択マーカー形質導入ベクターのコ・トランスフェクションにより作成したエリスロポエチン産生細胞によりエリスロポエチンの製造を示したものである。

#### エリスロポエチン形質導入ベクター (pMLVEP0) の作成

10μℓの水に溶解したプラスミド pSVhEPX 10μg に対し、5倍濃度のApaI反応緩衝液 (50mM Tris-HCl、50mM MgCl<sub>2</sub>、50mM メルカプトエタノール、0.05% BSA、pH 7.5) 20μℓ及び水70μℓを加えた後に制限酵素ApaI 20単位を加え、37℃ 1時間反応させた後、1回のフェノール抽出及び3回のエーテル抽出により、水層に含まれるフェノールを除去した後に2倍量のエタノールを加え、DNAを沈殿させた。遠心により、DNA (沈殿) を回収し、DNAを乾燥させた後に、78μℓの水、10倍濃度のT4DNAポリメラーゼ反応緩衝液 (670mM Tris-HCl、67mM MgCl<sub>2</sub>、100mM メルカプトエタノール、67μM EDTA、166mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、

0.167% BSA、pH 8.8) 10μℓ及び 2mM dNTP (dATP、dGTP、dCTP及びdTTPの混合液) 8μℓを加え、混合した後20単位のT4DNAポリメラーゼを加え、37℃ 10分間反応させた後、1回のフェノール抽出によりDNAを回収した後、予め TE-緩衝液で平衡化したSephadex G50 スパンカラムにより未反応のdNTPを除去した後、2倍量のエタノールを加え、DNAを沈殿させた。遠心によりDNA (沈殿) を回収し、乾燥した後に水80μℓ及び5倍濃度のBamHI反応緩衝液 (前記 BglII反応緩衝液に同じ) 20μℓを加えDNAを溶解した後に、制限酵素 BamHI 20単位を加え、37℃で1時間反応後、1回のフェノール抽出、3回のエーテル抽出により水層に含まれるフェノールを除去した後に、2倍量のエタノールを加え、DNA断片を沈殿させた。遠心により回収したDNA断片を乾燥した後に水 180μℓ、10倍濃度 EcoRI反応緩衝液 (500mM Tris-HCl、70mM MgCl<sub>2</sub>、1M NaCl、70mMメルカプトエタノール、0.1% BSA) 20μℓを加えてDNA



を溶解した後に、これに20単位の制限酵素 *EcoRI* を加え、37℃で1時間反応を行つた後、1回のフェノール抽出、3回のエーテル抽出により水層に含まれるフェノールを除去後、2倍量のエタノールを加え、DNA断片を沈澱させ、遠心により回収した後、常法に従い、1%アガロースゲル電気泳動を行い、エリスロポエチン遺伝子を含む *BamHI*-*Apal* 断片に相当するゲルの部位を切り出し、DE-81 ペーパー法により、4 $\mu$ g のDNA断片(エリスロポエチン遺伝子)を回収した。

一方、レトロウイルス(Molony Murine Leukemia Virus)LTRのプロモーターを含有するCAT発現ベクター-pMLVCAT 10 $\mu$ g(10 $\mu$ lの水に溶解)に10倍程度の *SmaI* 反応緩衝液(100mM Tris-HCl、70mM MgCl<sub>2</sub>、200mM KCl、70mMメルカプトエタノール、0.1%BSA)10 $\mu$ l、及び水80 $\mu$ lを加えた後、これに制限酵素 *SmaI* 10単位を加え、37℃で1時間反応した後、1回のフェノール抽出、3回のエーテル抽出、1回のエタノール沈澱操作によ

*Apal*断片を6 $\mu$ lのTE-緩衝液に溶解し、40%ポリエチレングリコール2 $\mu$ l、10倍濃度 ligation 反応緩衝液を加え、37℃で10分間、25℃で10分間、次いで4℃で10分間反応を行つた後、これに10mM ATP 1 $\mu$ l、1 $\mu$ lのT4 DNA ligase(2.8単位)を加え、4℃で1晩反応を行つた。得られた反応液についてTE-緩衝液40 $\mu$ lを加えた後に、1回のフェノール抽出、3回のエーテル抽出及び1回のエタノール沈澱操作を行つた後、遠心により、DNAを回収し、乾燥後20 $\mu$ lのTE-緩衝液に溶解して、形質転換用DNA溶液とした。このDNA溶液10 $\mu$ lを用いて200 $\mu$ lの大腸菌DH-1コンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン耐性形質転換細胞を得、プラスミドの制限酵素の切断地図解析を行い、目的とするエリスロポエチン形質導入ベクターを選択し、常法に従いプラスミド調製を行い、エリスロポエチン形質導入ベクター(pMLVEPO)を調製した。

選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクターの作成

り、DNAを回収し、乾燥後、160 $\mu$ lの水に溶解し、5倍程度の *BamHI*反応緩衝液40 $\mu$ lを加え、制限酵素20単位を加え、37℃で1時間反応を行つた後、1回のフェノール抽出、3回のエーテル抽出、1回のエタノール沈澱操作により、DNA断片を回収し、乾燥後150 $\mu$ lの水、5倍濃度のCIP反応緩衝液(250mM Tris-HCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM ZnCl<sub>2</sub>、5mM spermidine pH 9.0)、30単位のCIP(calf intestinal alkaline phosphate)を加え、37℃で15分間次いで56℃で15分間反応後更に30単位のCIPを加え、同様の反応を行つた後、1回のフェノール抽出、3回のエーテル抽出及び1回のエタノール沈澱操作により、DNAを回収した。得られたDNAを常法に従い、1%アガロースゲル電気泳動を行い、LTRのプロモーターを含有する *SmaI*-*BamHI*断片に相当するゲルの部位を切り出し、DE-81 ペーパー法により、4 $\mu$ g のDNA断片(pMLVに相当)を得た。

1 $\mu$ g の *SmaI*-*BamHI* 断片と2 $\mu$ g の *BamHI*-

10 $\mu$ lのTE-緩衝液に溶解した2.5 $\mu$ gのプラスミド pNEO に対し、10倍濃度の *HindIII* 反応緩衝液(100mM Tris-HCl、100mM MgCl<sub>2</sub>、500mM NaCl、10mM DTT、pH 7.5)10 $\mu$ l、滅菌水76 $\mu$ lを加えた後、50単位の *Hind III*を加え、37℃で2時間反応した後、1回フェノール抽出、3回エーテル抽出、エタノール沈澱1回の処理を行い、DNAを乾燥させた後、50 $\mu$ lの滅菌水に溶解した。本溶液に10倍濃度の Klenow 反応緩衝液(500mM Tris-HCl、100mM MgSO<sub>4</sub>、1mM DTT、500 $\mu$ g/ml BSA)、25 $\mu$ lの2mM dNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTPの混合液)、滅菌水113 $\mu$ l及び10単位の Klenow酵素(DNA polymerase I large fragment)を加え、22℃で30分間反応を行い、5'末端突起部位の修復を行つた。フェノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈澱1回の処理を行いDNAを乾燥させ、10 $\mu$ lの滅菌水に溶解した。

次に、3 $\mu$ lの *BamHI*リンカー(d(pCGGATCCG)、1 $\mu$ lの水に溶解)、10倍濃度の ligation 反応

緩衝液  $3\mu\text{L}$ 、滅菌水  $16\mu\text{L}$  及び  $4\mu\text{L}$  の T4-DNA ligase (11.2単位) を加え、 $22^\circ\text{C}$  6時間の反応を行った。フェノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈澱1回の処理後、DNAを乾燥させ、 $80\mu\text{L}$  の滅菌水に溶解し、5倍濃度の Bgl II 反応緩衝液  $20\mu\text{L}$ 、50単位の BamHI を加えて、 $37^\circ\text{C}$  で3時間反応を行った。本反応液を3.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことによりDNA断片を分離し、1496 bp の neo遺伝子に相当するゲルの部位を切り出し、ゲルを微細に破砕した後溶出用緩衝液  $400\mu\text{L}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で1晩の抽出を行った。遠心によりアクリルアミドゲルと水層とに分け、水層をフェノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈澱1回を行いDNAを精製した。

50ngの neo遺伝子 ( $19\mu\text{L}$  の水に溶解) と、 $110\mu\text{g}$  の Bgl II 切断 CIP処理 pKSV-10 ( $4\mu\text{L}$  の水に溶解) に10倍濃度の ligation 反応緩衝液  $3\mu\text{L}$ 、9mM ATP 溶液  $1.2\mu\text{L}$  及び  $2\mu\text{L}$  の T4-

DNA ligase (5.6単位) を加え、 $4^\circ\text{C}$  1晩の反応を行った。

反応液を2回フェノール抽出、3回エーテル抽出、1回のエタノール沈澱の処理を行ったのち、DNAを乾燥させ、 $20\mu\text{L}$  の TE-緩衝液に溶解し、形質転換用DNA溶液とした。その溶液  $5\mu\text{L}$  を用いて  $200\mu\text{L}$  の大腸菌 DH-1 コンピテント細胞に形質転換した。(形質転換頻度  $3 \times 10^4$  個/ $\mu\text{g}$  pBR322)。

以上の操作により21株のアンピシリン-カナマイシン耐性形質転換株を得た。うち11株についてプラスミドの制限酵素切断地図解析を行い、正確な方向に neo遺伝子の挿入された選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクターを有する4株を選択した。さらに、うち1株を用いて、常法に従いプラスミド調製を行い選択マーカー neo<sup>r</sup> 遺伝子導入ベクター (pKSV Neo) を調製した。尚本ベクターの動物細胞における neo遺伝子の発現は L-929細胞への neo遺伝子の形質導入を行い、G-418 耐性細

胞の生成により確認した。

#### BHK21細胞へのエリスロポエチン遺伝子の導入

実施例1に記載したと同様な手順で行った。すなわち、 $2 \times 10^4$  個の BHK21細胞を25cm<sup>2</sup>-Tフラスコに播種し、翌日DNAトランスフェクションを行った。 $50\mu\text{L}$  の水に溶解した  $50\mu\text{g}$  の pMLVEPO、 $5\mu\text{L}$  の水に溶解した  $5\mu\text{g}$  の pKSVNeo、 $300\mu\text{L}$  の2M塩化カルシウム液及び水  $2.1\text{mL}$  を混合しA溶液として使用した。DNAトランスフェクション後、G418耐性細胞を選択し、2回の限界希釈法を用いた細胞のクローン化を行い、エリスロポエチンを恒常的に生産する細胞株を樹立しEPOBM8Eと命名した。本細胞株のエリスロポエチン生産量はラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用いた in vitro バイオアッセイ法で調べた結果、両者は同一の活性を示し  $1300$  単位/ $10^4$  cell/day であった。

#### 組み換えエリスロポエチンの生産と単離

実施例1に記載したと同様な手順で行った。 $11\text{L}$

の培養上清 (EPO 活性  $1.7 \times 10^4$  単位) から精製を行い、抗体カラム、セファデックス G100 によるゲル濾過を経て、 $1.0 \times 10^4$  単位のエリスロポエチン活性が回収された。なお、最終標品は実施例1の標品と同様 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約 35000の単一のバンドを与えた。

出願人 雪印乳業株式会社

代理人 宮田 広 豊